รายงานการวิจัย

"การผลิตอาหารเสริมสุขภาพเพื่อป้องกันโรคข้อกระดูกเสื่อม จากเปลือกอาหารทะเล"

"Production of amino sugar food supplement from squid pen"

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

คณะผู้วิจัย:

รศ.ดร. มงคล สุขวัฒนาสินทธิ์ (หัวหน้าโครงการ)

อ.ดร. อนวัช อาชวาคม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน จากแผนงานวิจัย "นวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่" ประจำปีงบประมาณ 2550 ประเภทผลงานวิจัยเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยี ที่ให้การสนับสนุนด้านทุนในการทำวิจัยครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่
เลขทะเบียน 014123
วัน, เดือน, ปี 6 พ.ค. 52

บทคัดย่อ

การย่อยไคตินจากแกนหมึกด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* สามารถผลิตเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และเอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส [$(GlcNAc)_2$] อย่างเฉพาะเจาะจงได้ เอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g of chitin) สามารถย่อยไคติน (3% w/v) ที่ pH เป็น 3 อุณหภูมิ 40°C ได้ผลิตภัณฑ์เป็น GlcNAc ด้วยเปอร์เซนต์ผลผลิต 72% ภายในเวลา 2 วัน การย่อยไคติน (3% w/v) ด้วยเอนไซม์จากโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* (1 U/1 g of chitin) ที่ pH เท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37°C ทำการบ่มเป็นเวลา 6 วันให้ผลิตภัณฑ์เป็น $(GlcNAc)_2$ และ GlcNAc ด้วยเปอร์เซนต์ผลิตภัณฑ์ 43% และ 2.6% ตามลำดับ การทำให้ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล ตามด้วยการกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์หรือใช้คอลัมน์ที่มีผงถ่านกัมมันต์ให้ GlcNAc บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซนต์ผลผลิต 64% และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซนต์ผลผลิต 40%

การย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยการใช้และไม่ใช้คลื่นอัลตราโซนิคเพื่อให้ได้เกลือกลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการเตรียมเกลือ GlcNHCl คืออัตราส่วนไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1:1 (w/w) ขณะนี้การทดลองของการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นอยู่ในระหว่างการเก็บข้อมูล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

The degradation of squid pen by using enzymes of *Aspergillus fumigatus* and cloned bacteria *Serratia sp.* can be accomplished to specifically *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) and *N,N*-acetylchitobiose [$(GlcNAc)_2$]. Enzyme of *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g of chitin) can degrade chitin (3% w/v) at 40°C, pH 3, for 2 days, to give GlcNAc in 72% yield. The degradation of chitin (3% w/v) by using enzymes from bacteria *Serratia sp* (1 U/1 g of chitin) at 37°C, pH 6, for 6 days, to produce both $(GlcNAc)_2$ and (GlcNAc) in 72% and 2.6% yields respectively. The purification of (GlcNAc) and $(GlcNAc)_2$ could be done by recrystallization following by either the activated charcoal decolorization or the activated charcoal column chromatography to obtain pure GlcNAc in 64% yield and pure $(GlcNAc)_2$ and 40% yield.

The degradation of chitin by using conc. HCl to obtain Glucosamine hydrochloride salt (GlcNHCl) can be accomplished with or without ultrasonication. The conditions is to use chitin to conc. HCl ratio 1:1 (w/w) and the degradation by using conc. HCl is under investigation.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฉ
1.บทนำ	
1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	1
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	5
1.3 วัตถุประสงค์	6
1.4 ขอบเขตการวิจัย	7
1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย	7
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
2. เนื้อเรื่อง	7
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	9
2.2 ผลการวิจัย	10
2.2.1) Purification of GlcNAc by precipitation	11
2.2.2) Purification of $(GlcNAc)_2$ by precipitation	14
2.2.3) Activated charcoal column chromatography	15
a) Monitoring of separation between GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$	15
b) Elution system	17
c) Loading capacity of the activated charcoal column	18
3. วิจารณ์ผลการทดลอง	19
4. สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	20
บรรณานุกรม	21
สัญญา	23

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ข้อมูลการตกตะกอนของสาร Precipitation of standard GlcNAc in various solvent systems	11-12
ตารางที่ 2 ข้อมูลการตกตะกอนของสาร Precipitation of 30% (w/v) aqueous crude GlcNAc solution with ethanol	12
ตารางที่ 3 ข้อมูลของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส Hydrolysis of chitin by fed-batch method	13
ตารางที่ 4 Chromatogram of GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ eluted 10% ethanol stepwise gradient	19

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่	หน้า
1. a) แกนปลาหมึก b) แกนปลาหมึกบด c) แกนปลาหมึกที่มองผ่านกล้องจุลทรรศน์	10
2. Chromatogram of GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ eluted 10% ethanol stepwise gradient	14
3. %recovery and %purity of precipitates and supernatants from the precipitation of $(GlcNAc)_2$ from crude product.	15
4. Mass spectrum of a) GlcNAc and b) $(GlcNAc)_2$	16-17
5. Chromatogram of GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ eluted by a) 5% ethanol stepwise gradient and b) 10% ethanol stepwise gradient	18
6. Chromatogram of activated charcoal column loading by 0.44 g of total GlcNAc and $(GlcNAc)_2$.	19

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

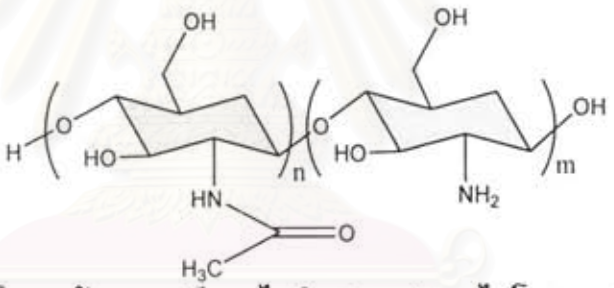
GlcNAc	*N*-Acetyl-*D*-glucosamine
$(GlcNAc)_2$	*N,N*-Acetylchitobiose
GlcNHCl	Glucosamine hydrochloride salt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HCl	Hydrochloric acid
U	Unit
g	Gram
mL	Milliliter
w/v	Weight by volume
w/w	Weight by weight

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. บทนำ

1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

โดยนิยามโครงสร้างเคมี ไคติน (chitin) หมายถึง poly(β-(1-4)-2-acetymido-2-deoxy-*D*-glucose) ซึ่งมีโครงสร้างของสายพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2-acetamido-2-deoxy- *D* -glucose หรือ *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) เป็นหน่วยซ้ำในสายพอลิเมอร์ ส่วนไคโตซาน (chitosan) หมายถึง poly(β-(1-4)-2-amido-2-deoxy- *D* -glucose) ที่มีน้ำตาล 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose หรือ *D* -glucosamine (GlcN) เป็นหน่วยซ้ำในสายโซ่พอลิเมอร์ อย่างไรก็ตามไคโตซานมักได้จากการทำปฏิกิริยาดีแอซิทิเลชั่น (deacetylation) ของไคตินในสารละลายด่างเข้มข้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นโคพอลิเมอร์ระหว่างน้ำตาล *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) และน้ำตาล *D* -glucosamine (GlcN) ในทางปฏิบัติไคตินจึงหมายถึง โคพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายในสารละลายกรดเจือจางเนื่องจากมีเปอร์เซนต์ ของ *N*-acetyl- *D*-glucosamine (GlcNAc) (degree of acetylation) มากกว่า 50% และไคโตซานหมายถึงโคพอลิเมอร์ที่ละลายได้ในกรดเจือจางเนื่องจากมีเปอร์เซนต์ของ *D* -glucosamine (GlcN) (degree of deacetylation) มากกว่า 50%



รูปที่ 1 โครงสร้างทางคมีของไคติน (n>m) และไคโตซาน (n<m)

เนื่องจากโครงสร้างของไคตินและไคโตซานมีหน่วยย่อยของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ไคตินและไคโตซานจึงสามารถถูกย่อยโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสให้ผลิตภัณฑ์เป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (chitooligosaccharide) และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในที่สุด ได้มีรายงานการทำไฮโดรไลซิสของไคตินและไคโตซานอยู่ 2 ลักษณะด้วยกันคือ การใช้กรดหรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในทางอุตสาหกรรมปัจจุบัน นิยมใช้วิธีการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) เนื่องจากเป็นกระบวนการผลิตที่ทำได้ค่อนข้างรวดเร็ว และใช้รีเอเจนต์ที่มีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยด้วยเอนไซม์

ในการตัดสายไคตินและไคโตซานเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ สามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมี[10] และการใช้เอนไซม์[11] ในส่วนของการใช้เอนไซม์นั้นจะมีข้อได้เปรียบด้านการควบคุมปฏิกิริยาซึ่งทำได้ค่อนข้างง่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง และมีปฏิกิริยาข้างเคียงน้อย และในหลายปีที่ผ่านมา มีผู้วิจัยศึกษาฤทธิ์ในการย่อยไคตินของ

เอนไซม์หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์จากรา, แบคทีเรียหรือเอนไซม์จากพืช ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีฤทธิ์ในการย่อยที่แตกต่างกันออกไปและได้ผลิตภัณฑ์ทั้งที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ขนาดต่างๆ[12,13]

ในกรณีของกรรมวิธีการย่อยไคตินนั้น ถึงแม้ว่าตามทฤษฎีปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะไกลโคซิดิกต้องการกรดเพียงเล็กน้อยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ในทางนั้นต้องใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ทั้งนี้เนื่องจากไคตินไม่ละลายในกรดเจือจางแต่สามารถละลายได้ในกรดหรือเบสเข้มข้น และมักใช้อุณหภูมิค่อนข้างสูงคือประมาณ 95-100°C ในการทำปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นเป็นเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทั้งพันธะไกลโคซิดิกและพันธะเอไมด์

คลื่นอุลตร้าโซนิคหมายถึง คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงเกินกว่าที่หูมนุษย์จะได้ยิน โดยทั่วไปแล้วหูของมนุษย์โดยเฉลี่ยจะได้ยินเสียงสูงถึงเพียงแค่ประมาณ 15 KHz เท่านั้น ดังนั้นโดยปกติแล้วคำว่าอุลตร้าโซนิคจึงมักจะหมายถึงคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงกว่า 20 KHz ขึ้นไป แต่ความถี่ที่ใช้ก็มักจะจำกัดอยู่เพียงไม่เกิน 50 KHz คลื่นอุลตร้าโซนิคเมื่อออกจากเครื่องกำเนิดหรือบางทีเราเรียกว่า "เครื่องโซนิเคเตอร์" แล้วสามารถถ่ายทอดพลังงานทางกลโดยการสั่นไปมากระจายไปในอากาศหรือของเหลวได้

ในกรณีที่โมเลกุลได้รับพลังงานของคลื่นอุลตร้าโซนิคแล้ว โมเลกุลจะดูดซับพลังงานที่ถ่ายทอดผ่านพาหะนั้นๆและทำให้ตัวโมเลกุลเกิดการสั่นได้มากขึ้น และตรงนี้เองที่เราสามารถนำพลังงานที่ดูดซับไปช่วยในการทำปฏิกิริยาต่างๆได้ เนื่องจากเมื่อโมเลกุลมีอัตราการสั่นตัวเพิ่มมากขึ้นเพราะฉนั้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะเพิ่มตามไปด้วยเช่นเดียวกัน เพราะฉนั้นในกรณีของปฏิกิริยาการย่อยไคตินถ้านำคลื่นอุลตร้าโซนิคมาใช้เราคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยในทุกๆด้านซึ่งจะทำให้ต้นทุนในการผลิต GlcNAc และ GlcNHCl ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ

1.1.1) การย่อยด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่สามารถนำมาใช้ในการย่อยมีสองชนิดคือเอนไซม์ที่ได้จากราและเอนไซม์ที่ได้เชื้อแบคทีเรีย

a. ศึกษาวิจัยการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินที่ได้จากรา

ในปี 2002 Nopakarn Rattanakit และคณะ[14] ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp.S1-13 โดยการหมักแบบแห้งที่มีเปลือกกุ้งและเปลือกปูที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเป็นสารอาหาร และบ่มที่อุณหภูมิ 45°C และ pH 4 เป็นเวลา 11-13 วัน ได้ *N*-acetylglucosamine 33% จากไคตินเริ่มต้น

ในปี 2003 Krissana A.[15] ได้ทดสอบรา 5 สายพันธุ์ *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma aureoviride*, *Trichoderma reesei* และ *Mucor sp.* สำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน รา *Aspergillus fumigatus* สามารถชักนำให้เกิดเอนไซม์ได้สูงที่สุด โดยให้แอคติวิตีสูงถึง 438 mU/ml เมื่อเลี้ยงด้วยคอลลอยดอลไคติน ที่อุณหภูมิ 40°C และมีปริมาณโปรตีนเป็น 1.70 mg/ml ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเบต้าไคตินโดยเอนไซม์ย่อยไคตินที่ผลิตจากรา *Aspergillus fumigatus* ให้ผลิตภัณฑ์เอ็น-แอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน มากกว่า 70 % ใน 1 วัน อัตราส่วนที่เหมาะสม

ของเอนไซม์ต่อไคตินคือ 1-4 mU/mg ที่ความเข้มข้นของสับเสตรทเป็น 20 mg/mL ช่วงพีเอชที่เหมาะสมคือ 3-5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 45°C ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถทำได้โดยไม่ต้องมีบัฟเฟอร์ซึ่งง่ายต่อการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ในระดับการผลิต

ในปี 2004 Parameswaran Binod และคณะ[16] ศึกษาการผลิตและการทำเอนไซม์ไคดิเนสให้บริสุทธิ์ โดยทำการคัดเลือก *Penicillium* 14 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวสาลีผสมกับไคติน ซึ่งเป็นการหมักแบบแห้ง และคัดเลือก *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคดิเนสได้ดีที่สุดที่เวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะการณ์ทำงานที่เหมาะสมที่พีเอช 5.5 และอุณหภูมิ 50°C ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตี้เท่ากับ 0.2 U/gds (gram dry substrate)

ในปี 2005 Laura Raminea – Coutiño และคณะ[17] ทำการคัดเลือกรา *Lecanicillium* sp. 15 สายพันธุ์ โดยการเลี้ยงแบบอาหารเหลวที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ พบว่า *Lecanicillium fungicola* ที่เลี้ยงที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 40°C สามารถผลิต endochitinase และ *N*-acetylhexosaminidase ได้แอคติวิตี้เท่ากับ 747 และ 410 U/mg ตามลำดับ

ในปี 2005 Patidar และคณะ[18] ทำการแยกรา *Aspergillus flavus* 15 สายพันธุ์ *Aspergillus niger* 6 สายพันธุ์ และ *Penicillium chrysogenum* ซึ่งทำการแยกจากดิน ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคดิเนส จาก *P. chrysogenum* , PPCS 1 และ PPCS 2 ที่สภาวะการหมักแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 40°C พีเอช 4 โดยที่ PPCS 1 ได้ไคดิเนสแอคติวิตี้ 3809 U/g ของไคตินเริ่มต้น และ PPCS 2 ได้ 2516 U/g ของไคตินเริ่มต้น

b. การศึกษาวิจัยการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินจากเชื้อแบคทีเรีย

ในปี 2001 Gemma Reguera และ Susan Leschine[19] ทำการศึกษาแบคทีเรีย *Cellulomonas* sp. 8 สายพันธุ์, *clostridium sp. 12 สายพันธุ์*, *Acetivibrio cellullolyticus*, *bacteroides cellulosolvens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ ที่สามารถย่อยไคตินได้ โดยแยกแบคทีเรียจากดินได้ทั้งหมด 22 สายพันธุ์ และเลือก *Cellulomonas uda* มาทำการเปรียบเทียบสภาวะที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลสกับไคตินและการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิด

ในปี 2002 Rath Pichyangkura และคณะ[20] ได้ทำการย่อยแอลฟาและเบต้าไคตินด้วยเอนไซม์chitinase (EC 3.2.1.14) and β-*N*-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) เพื่อทำการผลิต 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose (GlcNAc) โดยใช้ crude chitinase จากแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* TU09 และ *Bacillus licheniformis* SK-1 ในการย่อยผงแอลฟาและเบต้าไคติน พบว่า chitinase จาก *B. cepacia* TU09 ให้ผลผลิต GlcNAc มากกว่า 85 % จากเบต้าไคตินใน 1 วัน และจากแอลฟาไคตินใน 7 วัน และ chitinase จาก *B. licheniformis* SK-1 ย่อยเบต้าไคตินได้หมดภายใน 6 วัน ได้ GlcNAc 75 % กับ 20% ของ $(GlcNAc)_2$ และจากแอลฟาไคตินได้ 41% ของ GlcNAc

ในปี 2003 M.Gómez Ramírez และคณะ[21] ทำการคัดเลือกแบคทีเรีย wild type 150 สายพันธุ์ ซึ่งเลือก *Serratia marcescens* Wf ซึ่งผลิตเอนไซม์สูงสุด และ *B. thuringiensis* Bt-8 ซึ่งผลิตเอนไซม์ต่ำสุด มาทำการทดสอบการย่อยไคติน โดยใช้เทคนิคการย้อมสี colloidal chitin ด้วย

Remazal Brilliant Blue R® เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว โดยเมื่อ colloidal chitin ถูกย่อยจะปล่อยสีที่สามารถวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 595 นาโนเมตร

ในปี 2004 Purwani Yuli และคณะ[22] ศึกษาผลของการผลิตไคติเนสจากแบคทีเรียที่แยกจากน้ำพุร้อน Tompaso ทางเหนือของประเทศอินโดนีเซีย พบว่า *Bacillus* sp.13.26 สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีไคติน 0.5% ที่อุณหภูมิ 55°C และผลิตเอนไซม์ไคติเนสหลังจากผ่านไป 72 ชั่วโมง โดยเอนไซม์นี้จะมีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง มีแอคติวิตี้ 420 U/mg protein

ในปี 2004 Ju Hee Kuk และคณะ[23] ได้ทำการแยก *Aeromonas* sp. GJ-18 จากดิน และใช้ในการเตรียมเอนไซม์ ซึ่งมีเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *N*-acetyl-D-glucosaminidase และ *N,N'*-diacetylchitobiohy drolase ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ทำงานที่อุณหภูมิต่างกัน โดย *N*-acetyl-D-glucosaminidase จะผลิตให้ 74% ของ GlcNAc ที่อุณหภูมิ 45°C ใน 5 วัน และ *N,N'*-diacetylchitobio hydrolase จะผลิตให้ 35% ของ $(GlcNAc)_2$ ที่อุณหภูมิ 55°C ใน 5 วัน และในปีถัดมา Ju Hee Kuk และคณะ[24] ได้ต่อยอดการพัฒนาการย่อยไคติน ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น *N,N'*-diacetylchitobiose โดยการควบคุมอัตราส่วนของ β-*N*-acetylglucosaminidase ต่อ *N,N'*-diacetylchitobiohydrolase activities ในการเตรียม crude enzyme ของ *Aeromonas* sp. GJ-18 เมื่อบ่มอุณหภูมิที่ 50°C β-*N*-acetylglucosaminidase จะเสียสภาพ ในขณะที่ *N,N'*-diacetylchitobiohydrolase ยังคงมี activity อยู่ หลังจากย่อย swollen แอลฟาไคติน และผงเบต้าไคติน 7 วัน ได้ $(GlcNAc)_2$ 78.9 และ 56.6% ตามลำดับ

Aeromonas hydrophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นเป็นแท่งยาว มีแฟลกเจลาที่ขั้ว เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งแบบมีอากาศและแบบไม่มีอากาศ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°C พบทั่วไปในน้ำจืด มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้ 2 ชนิด ที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิต่างกัน คือ *N*-acetylhexosaminidase ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 37°C ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นน้ำตาล*เอ็น*-แอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน และ *N,N'*-diacetylchitobio-hydrolase ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 50°C ได้*เอ็น,เอ็น*-ไดแอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aeromonas hydrophila* MOK-1 จากดินในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาทำการย่อยแอลฟาและเบต้าไคตินในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้ได้น้ำตาลเอ็น-แอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน และ *เอ็น,เอ็น*-ไดแอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน และเพิ่มขนาดการผลิตน้ำตาลแอมิโนโดยใช้ไคติน 100 กรัม ทำการแยกผลิตภัณฑ์น้ำตาล*เอ็น*-แอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน และ *เอ็น,เอ็น*-ไดแอซิทิล-ดี-กลูโคซามีนให้บริสุทธิ์ ซึ่งความแตกต่างจากงานวิจัยของ Ju Hee Kuk และคณะ จะอยู่ที่สายพันธุ์ของแบคทีเรีย สเกลในการผลิต และการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์

1.1.2) การย่อยด้วยกรด

รายงานการเตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) จากการย่อยไคตินด้วยกรดปรากฏขึ้นครั้งแรกตั้งแต่ปี 1946 โดย Purchase และ Braun[25] ได้ทำการย่อยไคตินขนาด 20 กรัม

ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 116 กรัม ที่อุณหภูม 100°C เป็นเวลา 150 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเติมน้ำ 100 กรัม และผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) 2 กรัม กวนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมากรองเอาส่วนใสมาระเหยภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 50°C ได้เกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) ซึ่งเมื่อล้างด้วยเอทานอล 95% และทำให้แห้งแล้วได้ผลิตภัณฑ์ 67.5% ที่มีความบริสุทธิ์ 95.31%

ในปี 1997 Novikov และ Ivanov[26] ได้เตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) จากการย่อยไคติน 100 กรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 200 กรัม ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นตั้งสารละลายที่ได้จากการย่อยไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดผลึกเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) นำมากรองและล้างสีเหลืองของผลึกด้วยเอทานอล 194 กรัม ได้ผลิตภัณฑ์ 70% ซึ่งมีความบริสุทธิ์ 100% จากการไทเทรตด้วยเบส

ในปี 2002 Gandhi และ Laidlhi[27] ได้เตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) จากการย่อยไคตินขนาด 20 mesh ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยใช้สัดส่วนของไคตินต่อกรดเป็น 1:2 (W:W) โดยจะมีการให้ความร้อนแก่กรดจนกระทั่งอุณหภูมิถึง 65°C แล้วจึงเติมไคติน และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 95°C หลังจากนั้น 75 นาที ตั้งสารละลายให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง กรองตะกอนที่เกิดขึ้น นำมาละลายน้ำและเติมผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) กรองเอาส่วนที่ใสมาระเหยจนแห้งเหลือผลึกเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) ซึ่งเมื่อล้างด้วยเอทานอล 95% ได้ผลิตภัณฑ์ 70% ที่มีความบริสุทธิ์ 100%

ในปี 2004 Novikov[28] ได้ศึกษาการย่อยไคตินและไคโตซานด้วยกรดไฮโรคลอริกเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 50°C และ 70°C พบว่ากลไกของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะ *N*-acetyl และพันธะ glycosidic ต่างกัน คือพันธะ *N*-acetyl เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกลไก S_AN2 โดย rate-determining step เกิดจากการเติมโมเลกุลน้ำเข้าที่ carbocation ส่วนพันธะ glycosidic นั้นเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกลไก S_N1 โดย rate-determining step เกิดจากการที่โปรดอนเข้าทำที่ carbocation ซึ่งอัตราเร็วขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำ

จากการรายงานที่ได้อธิบายมาขั้นต้นยังไม่มีการใช้โซนิเคเตอร์มาช่วยในการย่อยไคตินด้วยกรดแต่อย่างใด เพราะฉนั้นถ้าเราสามารถนำเอาโซนิเคเตอร์มาช่วยในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไคตินด้วยกรดเพื่อใช้ในการเตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) หรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว *เอ็น*-แอซีทิล-*ดี*-กลูโคซามีน (GlcNAc) เราคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยไคตินด้วยกรดดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ และหาสภาวะที่เหมาะสมที่ควบคุมการย่อยให้เกิดเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว *เอ็น*-แอซีทิล-*ดี*-กลูโคซามีน (GlcNAc)

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ไคตินและไคโตซานเป็นสารที่มีมากในเปลือกกุ้ง กระดองปู และแกนหมึก ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งที่ยังมีการนำมาใช้ประโยชน์ไม่มากเท่าที่ควร ถึงแม้ประเทศไทยได้มีการผลิตไคตินและไคโตซานจากของเหลือทิ้งเหล่านี้มาเป็นเวลาพอสมควร แต่การผลิตยังถือว่ามีปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณของเหลือทิ้ง นอกจากนี้ไคโตซานที่ผลิตได้มักจะส่งออกในรูปของวัตถุดิบราคาต่ำ การวิจัย

และพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากไคตินให้มีมูลค่าสูงขึ้นจึงเป็นสิ่งจำเป็น

ไคติน (chitin) เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีคือ poly(β-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose) หรือเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (*N*-acetyl-*D*-glucosamine) เป็นหน่วยซ้ำหลักในสายพอลิเมอร์ ส่วนไคโตซาน (chitosan) ได้จากการทำปฏิกิริยาดีอะซิทิเลชันของไคตินในสารละลายด่างเข้มข้น ดังนั้นไคโตซานจึงประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีส่วนใหญ่เป็น poly(β-(1-4)-2-amino-2-deoxy- *D*-glucose) หรือดี-กลูโคซามีน (*D*-glucosamine) เป็นหน่วยซ้ำหลัก ไคตินและไคโตซานมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับเซลลูโลส แตกต่างกันที่หมู่แทนที่บนคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส (pyranose ring) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเซลลูโลสโดยหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งนี้ของเซลลูโลสจะเป็นหมู่ไฮดรอกซิลแต่ของไคตินเป็นหมู่อะซิทาไมด์ (NHAc) ส่วนไคโตซานเป็นหมู่อะมิโน (NH_2)

ไคติน-ไคโตซานที่ผลิตขึ้นภายในประเทศส่วนใหญ่จะส่งออกในรูปของวัตถุดิบราคาถูก (กิโลกรัมละ 400-1000 บาท) ดังนั้นการวิจัยเพื่อหาวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น จึงเป็นการช่วยเปลี่ยนของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งให้กลายเป็นทรัพยากรที่มีค่าของประเทศ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นการวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีที่มั่นคงและยั่งยืน เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ที่ขายในรูปสารเคมีปัจจุบันมีราคากว่า 57,700 บาท/กิโลกรัม ส่วนไดเมอร์ของไคตินคือ เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส มีราคาสูงกว่า 900,000 บาท/กรัม และโอลิโกเมอร์ที่มีขนาด 3-7 หน่วยนั้นมีราคาสูงขึ้นไปอีกตามลำดับ[1] ซึ่งสารเหล่านี้ใช้เป็นส่วนผสมหลักในยารักษาอาการเจ็บปวดตามข้อกระดูกสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคออสทีโออาร์ไทรทีส (osteoarthritis)[2] โครงการวิจัยนี้จึงอาจถือได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการแปรรูปวัถดุดิบคือไคติน และไคโตซานให้เป็นสารเคมีโมเลกุลขนาดเล็กลงที่มีประโยชน์ในทางเภสัชกรรมที่มีราคาสูงขึ้น

ในงานวิจัยเบื้องต้นของเราพบว่าเอนไซม์จาก Burkoderia cepacia สามารถใช้ผลิตเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน จาก ไคติน มากกว่า 90% ในเวลา 1 วัน โดยอัตราค่าใช้จ่ายในการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการจะอยู่ที่ประมาณ 800-1,500 บาท/กิโลกรัม และถ้าขยายขนาดการผลิตก็จะสามารถลดราคาการผลิตต่อกิโลกรัมลงอย่างมีนัยสำคัญได้อีก อย่างไรก็ตามจุดเด่นของการวิจัยนี้ไม่ได้อยู่ที่ต้นทุนการผลิตต่ำแต่เพียงอย่างเดียว แต่อยู่ที่ความปลอดภัยและความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่มีมากกว่าวิธีการผลิตโดยใช้สารเคมีซึ่งมีกระบวนการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ที่ยุ่งยากซับซ้อน

1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 ศึกษาการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์เพื่อเตรียม เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และ เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส [$(GlcNAc)_2$] และ ศึกษาหาวิธีแยกผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ออกจากของผสมในปฏิกิริยา

1.3.1 ศึกษาการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริคเพื่อเตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) และ ศึกษาหาวิธีแยกผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ออกจากของผสมในปฏิกิริยา

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษาหาเอนไซม์ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยไคตินให้เป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และไดแอซิทิลไคโตไบโอส [$(GlcNAc)_2$] พร้อมทั้งการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยไคตินให้เป็นผลิตภัณฑ์เกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) ด้วยกรดไฮโดรคลอริค

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

-แบ่งแนวทางวิธีดำเนินการวิจัยเป็นสองทางคือ

1.5.1) การย่อยด้วยเอนไซม์

1.5.2) การย่อยด้วยกรด

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลงานตีพิมพ์ลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์คือภาคอุตสาหกรรมทางด้านการแปรรูปอาหารทะเล

2. เนื้อเรื่อง

น้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (*N*-acetyl-*D*-glucosamine) และไคโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (Chitooligo-sacchride) เป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเล็กที่ได้จากการตัดสายไคตินและไคโตซาน ซึ่งมีความสำคัญทางชีวภาพสำหรับทั้งสัตว์และพืช จึงได้มีการศึกษาและนำไปประยุกต์ใช้ทั้งทางด้านเภสัชกรรมและเกษตรกรรม[20] เช่น ช่วยรักษาอาการเจ็บปวดตามข้อกระดูกสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคออสทีโออาร์ไทรทีส[2]นี้ ช่วยทำให้ภูมิคุ้มกันภายในร่างกายมีประสิทธิภาพมากขึ้น[21] เป็นสารที่ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย[22] เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์หลายประเภทในร่างกายรวมทั้งยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอกภายในร่างกาย[23] และต่อต้านคัดรูพืชที่มารบกวนได้อีกด้วย[24, 25] น้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ยังใช้สังเคราะห์ต่อเป็นอนุพันธ์ต่างๆ ของยาเพราะเชื่อว่าจะทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากขึ้น[26]

ในการตัดสายไคตินและไคโตซานเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ สามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมี[27] และการใช้เอนไซม์[28] แต่การใช้เอนไซม์นั้นจะมีข้อได้เปรียบมากกว่าวิธีการทางเคมีหลายประการ เช่น การควบคุมปฏิกิริยานั้นทำได้ค่อนข้างง่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงและมีปฏิกิริยาข้างเคียงน้อย

ในหลายปีที่ผ่านมา มีผู้วิจัยศึกษาฤทธิ์ในการย่อยไคตินของเอนไซม์หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์จากรา แบคทีเรียหรือเอนไซม์จากพืช ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีฤทธิ์ในการย่อยที่แตกต่างกันออกไปและได้ผลิตภัณฑ์ทั้งที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ขนาดต่างๆ[4, 29]

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการผลิตน้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนและเอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอสจากการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดคือ เอนไซม์ดิบจากราแอสเพอร์จิลลัส ฟูมิเกทัส

(*Aspergillus fumigatus*) เอนไซม์ไค60 (Chi60) จากแบคทีเรียในเซอร์ราเทียสปีชีส์ (*Serratia sp.*) และเอนไซม์จากซีรัมน้ำยางที่มีชื่อว่า เฮวา บราซิลเลียนซิส(*Hevea brasiliensis*) โดยศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและทำการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากของผสมในปฏิกิริยา

มีคณะผู้วิจัยหลายคณะได้ศึกษาถึงการผลิตน้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากไคติน เนื่องจากสารเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งทางการแพทย์ เภสัชกรรมและเกษตรกรรม แต่ในปัจจุบันการผลิตน้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้มาจากการนำไคตินและไคโตซานมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรดหรือด่าง แต่กระบวนการเหล่านี้ต้องอาศัยสภาวะที่รุนแรง เช่น อุณหภูมิสูง ความดันสูง และปฏิกิริยามักจะมีความจำเพาะต่ำ ให้เปอร์เซนต์ของผลิตภัณฑ์น้อย อีกทั้งยังต้องมีกระบวนการในการกำจัดกรดหรือสารที่ใช้เร่งปฏิกิริยาก่อนนำมาใช้ และของเสียจากกระบวนการผลิตนี้สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ ในหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการนำเอนไซม์มาใช้ตัดสายไคตินและไคโตซาน เพราะสามารถทำได้ง่าย ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาการตัดได้ที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยาได้ง่าย ให้เปอร์เซนต์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูง มีของเสียที่เกิดจากการผลิตต่ำและมีความเป็นพิษน้อย

เราสามารถพบเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยไคตินและไคโตซานในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น มนุษย์, สัตว์ (เช่น กุ้ง, ปู, แมลงต่าง ๆ), พืช (เช่น ข้าว, ใบยาสูบ, ยางพารา, มันเทศ และถั่วต่าง ๆ) และจุลินทรีย์ โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ใช้เอนไซม์เพื่อประโยชน์ในการดำรงชีพต่างๆ กัน เช่น ในการลอกคราบหรือแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต การย่อยอาหารและการทำลายศัตรูหรือสิ่งมีชีวิตที่มารุกราน เป็นต้น เอนไซม์เหล่านี้มีสามกลุ่มใหญ่คือ ไคทิเนส (chitinase), เฮกโซซามินิเดส (hexosaminidase) และ ไคโตซานเนส (chitosanase) โดยที่เอนไซม์แต่ละกลุ่มจะมีสมบัติและการทำงานที่แตกต่างกันออกไปดังนี้

1. ไคทิเนส (chitinase: EC 3.2.1.14, glycohydrolase family 18 และ 19) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการตัดไคตินได้ทั้งบริเวณปลายสายและกลางสาย ให้ผลิตภัณฑ์เป็น น้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน, เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส (N,N'-diacetylchitobiose) หรือเอ็น-แอซีทิลไคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดที่จำเพาะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ โดยเอนไซม์ไคทิเนสนี้ถูกแบ่งเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ แฟมิลี่ 18 และ 19 ซึ่งแบ่งตามกลไกการเกิดปฏิกิริยาและโครงสร้างของเอนไซม์

2. เฮกโซซามินิเดส หรือ ไคโตไบเอส (hexosaminidase หรือ chitobiase: EC 3.2.1.52, glycohydrolase family 3 และ 20) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการตัดไคตินจากบริเวณปลายสายเท่านั้น หรือเร่งปฏิกิริยาการตัดไคโตไบโอสแล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาล เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนสองโมเลกุล

3. ไคโตซานเนส (chitosanase: EC 3.2.2.132, glycosylhydrolase family 46) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการตัดสารไคโตซานโดยจะไม่ตัดสายไคตินและให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคซามีนหรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ของ กลูโคซามีน

กลุ่มวิจัยของเราเองก็ได้ทำการศึกษาทางด้านนี้มาพอสมควรและเคยได้รับทุนสนับสนุนจากทางมูลนิธิโทเร และปัจจุบันจากสถาบันวิจัยโลหะและวัสดุแห่งชาติ มีผลงานตีพิมพ์ในระดับห้องปฏิบัติทางด้านนี้ 4 บทความ ในช่วง 2 ปีที่ผ่านมา เราจึงมีความสนใจที่จะขยายขอบเขตและพัฒนางานวิจัยนี้ให้สามารถพัฒนาไปสู่การใช้จริงในอุตสาหกรรมได้ในที่สุด

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการผลิตน้ำตาลแอมิโนจากการย่อยไคตินจากแกนหมึกด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดคือ เอนไซม์ดิบจากราแอสเพอร์จิลลัส ฟูมิเกทัส (*Aspergillus fumigatus*) เอนไซม์ไค60 (Chi60) จากแบคทีเรียในเซอร์ราเทียสปีชีส์ (*Serratia sp.*) และเอนไซม์จากซีรัมน้ำยางที่มีชื่อว่า เฮวา บราซิลเลียนซิส (*Hevea brasiliensis*) โดยศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและทำการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากของผสมในปฏิกิริยา

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & method)

2.1.1) การย่อยด้วยเอนไซม์

a. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
b. จัดหาสารเคมีและวัตถุดิบที่จำเป็น
c. นำ *Aeromonas hydrophila* MOK-1 ที่คัดเลือกสายพันธุ์แล้วว่าสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้ จากดร. รัฐ พิชญางกูร ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อนำไปศึกษาต่อ และเก็บเป็น stock เชื้อ
d. ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของ *Aeromonas hydrophila* MOK-1 หาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมาก เช่น
   - การใช้แอลฟาและเบต้าไคตินที่ระดับ 0.5, 1, 1.5 และ 2% เป็นแหล่งคาร์บอน
   - อุณหภูมิที่ 30 – 50 °C
e. หาสภาวะที่เหมาะสมกับการย่อยของเอนไซม์
   - อุณหภูมิที่เหมาะสมแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ 30 – 45 °C และ 45 - 60°C
   - พีเอชที่เหมาะสมโดยศึกษาในช่วง pH 3.5 - 8
f. ย่อยไคตินด้วยเอนไซม์ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลแอมิโนโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ โดยใช้วิธีการหมักแบบครั้งเดียว, แบบกึ่งต่อเนื่อง และแบบต่อเนื่อง
g. ทำการแยกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้บริสุทธิ์
h. วิเคราะห์ สรุปผล และเขียนเขียนรายงาน และเตรียมบทความเพื่อลงตีพิมพ์หรือ จดสิทธิบัตร

2.1.2) การย่อยด้วยกรด

a. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

c. ศึกษาการย่อยไคตินจากเปลือกกุ้งบดขนาด 200 mesh ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (12 M) ที่ระยะเวลาต่างๆกัน โดยใช้โซนิเคเตอร์ช่วย

d. ทำการแยกผลิตภัณฑ์เกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) พร้อมทั้งคำนวณหาเปอร์เซนต์ผลผลิต เปรียบเทียบกับการย่อยโดยไม่ใช้คลื่นโซนิเคเตอร์

e. หา activity ของการย่อยโดยใช้ โซนิเคเตอร์เป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย

f. ศึกษาปัจจัยของอัตราส่วนระหว่างปริมาณไคตินกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นที่มีต่อเปอร์เซนต์ผลผลิตแบบใช้โซนิเคเตอร์

g. หาค่า pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อย

h. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วย HPLC

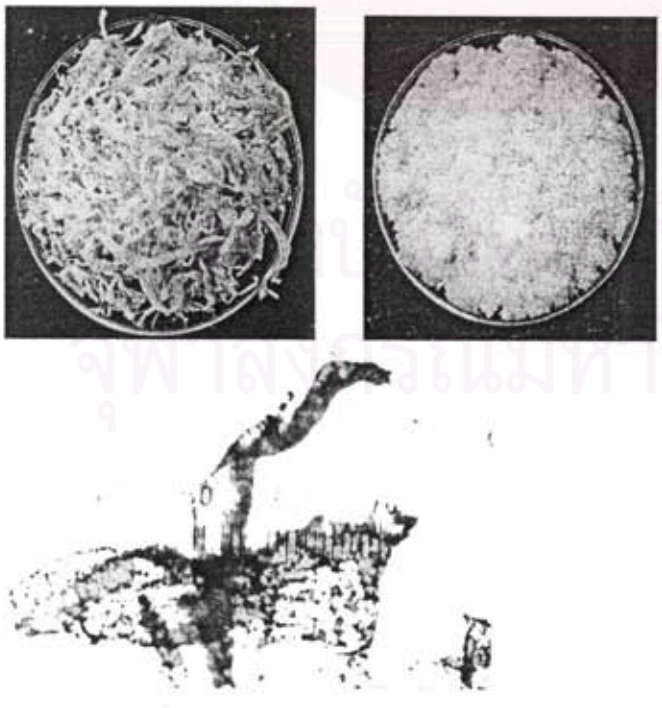
i. แยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วย การตกตะกอน หรือโครมาโทกราฟฟี

j. เขียนรายงาน และเตรียมบทความเพื่อลงตีพิมพ์ หรือ จดสิทธิบัตร

สถานที่ทำการทดลอง ณ ชั้น 13 ตึกมหามกุฏ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ผลการวิจัย

การเตรียมสารเคมีและวัตถุดิบที่จำเป็นการนั้นได้ทำการเตรียมแกนปลาหมึกที่เป็นสารตั้งต้นโดยการบดด้วยอุลตร้าโซนิค เพื่อให้ได้เส้นใยไคตินที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 500 ไมโครเมตร ความยาว 0.1-1 มิลลิเมตร (Figure 1)



a) b) c)

Figure 1 a) แกนปลาหมึก b) แกนปลาหมึกบด c) แกนปลาหมึกที่มองผ่านกล้องจุลทรรศน์

จากนั้นนำวัตถุดิบที่ได้มาเตรียมคอลลอยด์ไคตินโดยทำการเตรียมในสภาวะที่เป็นกรดจะได้slurry สีขาว นำคอลลอยด์ไคตินที่เตรียมมาหาแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ ซึ่งในงานวิจัยเบื้องต้นของ

เราพบว่าเอนไซม์จาก ฟังไจ *Aspergillus fumigatus* และ แบคทีเรีย *Serratia sp.* (*Chi60*) สามารถใช้ผลิต เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีนจาก α-chitin สำหรับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus fumigatus* นั้น จะนำส่วนที่ย่อยแล้วไปต้มแล้วกรองและ freeze dried นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโดย HPLC ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของแข็งที่ได้หลังจากการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์ดังกล่าวให้เปอร์เซนต์ผลิตภัณฑ์ GlcNAc เท่ากับ 60 w/w และสามารถคำนวณเมื่อเทียบกับน้ำหนักไคตินตั้งต้นให้เปอร์เซนต์ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 72 อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่เป็นของแข็งนี้ยังไม่บริสุทธิ์เท่าที่ควรจึงมีความจำเป็นที่จะต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยกรรมวิธีการตกตะกอนหรือการตกผลึก

2.2.1) Purification of GlcNAc by precipitation

จากรายงานความก้าวหน้าครั้งที่แล้ว ได้นำเอาผลิตภัณฑ์ไคตินที่เป็นของแข็งที่ผ่านขบวนการย่อยแบบ single-batch แล้วด้วยเอนไซม์ *A.fumigatus* มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโดย HPLC ให้เปอร์เซนต์ผลิตภัณฑ์ GlcNAc เท่ากับ 60 w/w และสามารถคำนวณเมื่อเทียบกับน้ำหนักไคตินตั้งต้นให้เปอร์เซนต์ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 72 อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่เป็นของแข็งนี้ยังไม่บริสุทธิ์เท่าที่ควรจึงมีความจำเป็นที่จะต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยกรรมวิธีการตกตะกอนหรือการตกผลึก

สารละลายอินทรีย์ที่เลือกใช้ในการตกตะกอนคือ เอทานอล, อะซิโดน และอะซิโดไนไตรล์ เพื่อนำมาตกตะกอน GlcNAc ออกจากสารละลายของเหลว เพราะสามารถเข้ากับน้ำได้ดี สารละลายของน้ำตาล GlcNAc มาตรฐาน (20% w/v) ได้ถูกนำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าระหว่างสารละลายทั้ง 3 ชนิด เอทานอลเหมาะที่สุดสำหรับนำมาตกตะกอน GlcNAc (~80%) ที่อัตราส่วนระหว่างเอทานอล:น้ำ เท่ากับ 15:1(v/v) **(Table 1)** ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อมา การตกตะกอน GlcNAc ออกจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเลือกใช้น้ำ-เอทานอลเพื่อใช้ในระบบ

organic solvent	organic:water	%precipitate
ethanol	1	54
	2	69
	5	82
	10	75
	15	80

acetone	1	9.6
	2	8.3
	4	54
	8	59
	15	69
acetonitrile	1	0
	2	0
	4	13
	8	19
	15	20

Table 1 Precipitation of standard GlcNAc in various solvent systems

สารละลายของ GlcNAc (30% w/v) ถูกเติมลงไปในเอทานอล ที่อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำที่แตกต่างกันเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำให้ตะกอน GlcNAc ที่ตกออกมามีปริมาณที่ได้กลับมาและความบริสุทธิ์สูงสุด นำทั้งส่วนที่เป็นตะกอนและของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล GlcNAc โดย HPLC จากผลการทดลองแสดงว่าปริมาณของตะกอนมีเพียง 9-12% และส่วนที่เหลือทั้งหมดในสารละลาย **(Table 2)** การระบุถึงความเข้นข้นของ GlcNAc เบื้องต้นนั้นบางทีอาจจะต่ำมาก ปริมาณน้ำตาลในส่วนใสมีปริมาณมากกว่าที่พบในตะกอนสัดส่วนของ เอทานอล/น้ำสูง ความบริสุทธิ์ของน้ำตาลในส่วนใส จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 72 ถึง 81% (w/w) จากผลการทดลองพบอีกว่าส่วนที่ไม่บริสุทธิ์จะสามารถละลายน้ำได้น้อยกว่า ภายใต้สภาวะการตกตะกอน GlcNAc ที่มีความเข้มข้นสูงในส่วนของของเหลวเริ่มต้นสามารถทำให้ตกตะกอนน้ำตาลออกมาง่ายขึ้น

ethanol:water ratio (v/v)	precipitate		supernatant	
	%recovery	%purity	%recovery	%purity
1	12	52	68	72
2	11	66	72	73
5	9	54	73	75
10	12	66	69	77
15	10	45	72	81

Table 2 Precipitation of 30% (w/v) aqueous crude GlcNAc solution with ethanol

นอกจากการย่อยแบบ single-batch แล้วยังได้ทำการย่อยไคตินแบบ fed-batch ด้วย วิธีการย่อยแบบ fed-batch นั้นใช้ปริมาณไคตินทั้งหมด 12 กรัม และ 25 กรัม และเอนไซม์จาก *A. fumigatus* ไคตินที่ย่อยแล้วถูกทำให้มีความเข้มข้นที่มีปริมาตรเท่ากับ 30 มิลลิลิตร และเติม absolute เอทานอลในสัดส่วนเอทานอลต่อน้ำเท่ากับ 7/1 เฉพาะส่วนที่ย่อยแล้วจากส่วนของไคติน 25 กรัมทำให้ได้ตะกอน และนำมาวิเคราะห์ HPLC พบว่ามีความบริสุทธิ์ของ GlcNAc 90% ได้เปอร์เซนต์ของ GlcNAc ซึ่งมาจากการคำนวณน้ำหนักของตะกอนเท่ากับ 56% จากการย่อยไคตินเริ่มต้น 12 กรัม นำส่วนของเหลวที่ได้จากการกรองมาทำให้แห้งภายใต้สภาวะสูญญากาศให้เปอร์เซนต์ของ GlcNAc เท่ากับ 71% และความบริสุทธิ์ 91% **(Table 3)** ผลการทดลองแสดงว่าการตกตะกอน GlcNAc ด้วยเอทานอลได้ผลสำเร็จจากความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย GlcNAc

Total chitin (g)	Total enzyme (U)	GlcNAc obtained from	% yield	%purity
12	48	Filtrate	71	91
25	100	Precipitate	56	90

Table 3 Hydrolysis of chitin by fed-batch method

ตั้งแต่การตกตะกอนตกผลิตภัณฑ์ออกมาที่มีสีเหลืองอ่อนและมีความบริสุทธิ์ 90% ซึ่งเป็นผลที่ไม่น่าพอใจ การกำจัดสี (decolorization) จึงเป็นวิธีที่ช่วยส่งเสริม ปรับปรุงความบริสุทธิ์ของ

นอกนั้นเรายังได้ทำการศึกษาการย่อยไคตินจากเกล็ดปลาหมึก (9 g) ด้วยเอนไซม์ที่ได้จาก *Serratia sp.* (9U) ด้วยโดยสภาวะที่ใช้ในการย่อยอยู่ที่ pH 6และอุณหภูมิ 37°C หลังจากการย่อยผ่านไป 6 วัน นำcrude product มาวิเคราะห์ด้วย HPLC พบ $(GlcNAc)_2$ อยู่ 63% w/w และ GlcNAc 2% w/w (8/1 $(GlcNAc)_2$ / GlcNAc mole ratio) และให้เปอร์เซนต์ของผลิตภัณฑ์จากการคำนวณที่ 43% Crude product ถูกเก็บไว้ในรูปของแข็งหลังจากที่ทำการทำให้แห้งก่อนที่จะผ่านการตกตะกอนเหมือนกับที่ทำมาตั้งแต่แรกกับ GlcNAc สำหรับการแยก $(GlcNAc)_2$ จาก crude product ซึ่ง crude product ที่เป็นสารละลายเริ่มต้น (30% w/w) การตกตะกอนโดยวิธีการเติม เอทานอลที่สัดส่วนระหว่าง เอทานอลกับน้ำแตกต่างกัน การวิเคราะห์ด้วย HPLC แสดงว่าความบริสุทธิ์ของ $(GlcNAc)_2$ ในส่วนที่เป็นตะกอนไม่บริสุทธิ์เท่าที่ควร [30-40%(w/w)] เพราะฉนั้นเรามีความจำเป็นในการปรับปรุงวิธีการเพิ่มความบริสุทธิ์ของ $(GlcNAc)_2$ และวิธีที่เราเลือกใช้คือ คอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์ และปัจจัยที่ได้ศึกษาคือ ระบบตัวชะ, loading capacity ของคอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์และปริมาตรสารละลาย crude $(GlcNAc)_2$ จากนั้นใช้เครื่อง Mass spectrometry เพื่อวิเคราะห์ตรวจสอบการแยกระหว่าง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$

ผลการศึกษาระบบตัวชะแสดงให้เห็นว่าการใช้ 0-10% เอทานอลปริมาตร 500 mL เป็นตัวชะครั้งแรกสามารถชะ GlcNAc ได้สำเร็จ หลังจากนั้นใช้ 20% เอทานอลเพื่อชะ $(GlcNAc)_2$ ซึ่งระบบนี้สิ้นสุดการชะหลังจากผ่านไป 8 ชั่วโมงสามารถชะ $(GlcNAc)_2$ ออกมาได้หมดด้วยการใช้ตัวชะประมาณ 1000 mL จากผลการทดลองนี้พบว่า การใช้ 10%การชะทีละขั้นเร็วกว่าการชะปกติ **(Figure 2)**

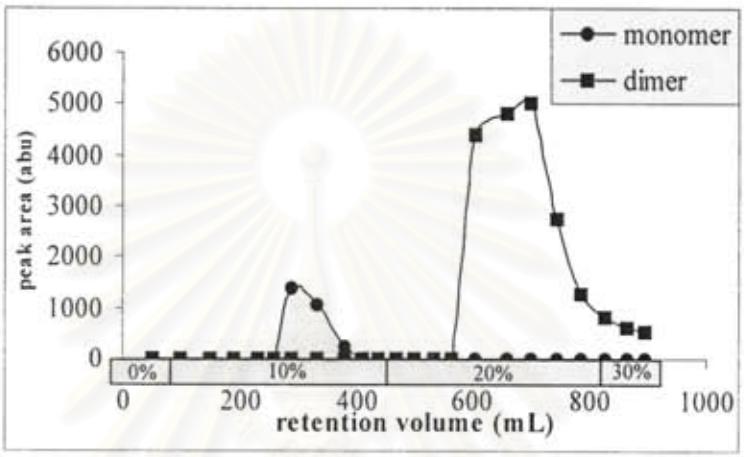


Figure 2 Chromatogram of GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ eluted 10% ethanol stepwise gradient

2.2.2) Purification of $(GlcNAc)_2$ by precipitation

นำ crude product ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ได้จาก *Serratia sp.* (9U) ที่ pH 6 และอุณหภูมิ 37°C หลังจากการย่อยผ่านไป 6 วัน มาผ่านกระบวนการตกตะกอนเหมือนกับที่ทำมาตั้งแต่แรกเพื่อสำหรับการแยก $(GlcNAc)_2$ จาก crude product ซึ่ง crude product ที่เป็นสารละลายเริ่มต้น (30% w/w) การตกตะกอนโดยวิธีการเติม เอทานอลที่สัดส่วนระหว่าง เอทานอลกับน้ำแตกต่างกัน การวิเคราะห์ด้วย HPLC แสดงว่าความบริสุทธิ์ของ $(GlcNAc)_2$ ในส่วนที่เป็นตะกอนเท่ากับ 30-40%(w/w) ซึ่งเป็นการหยดมาจาก crude product (63% w/w) ความบริสุทธิ์ของ $(GlcNAc)_2$ ส่วนใส ถูกเปรียบกับ crude productเริ่มต้น **(Figure 3)** ผลการทดลองพบว่าความบริสุทธิ์ของ $(GlcNAc)_2$ ไม่สามารถที่จะปรับปรุงได้โดยวิธีการตกตะกอน crude $(GlcNAc)_2$ ในเอทานอล

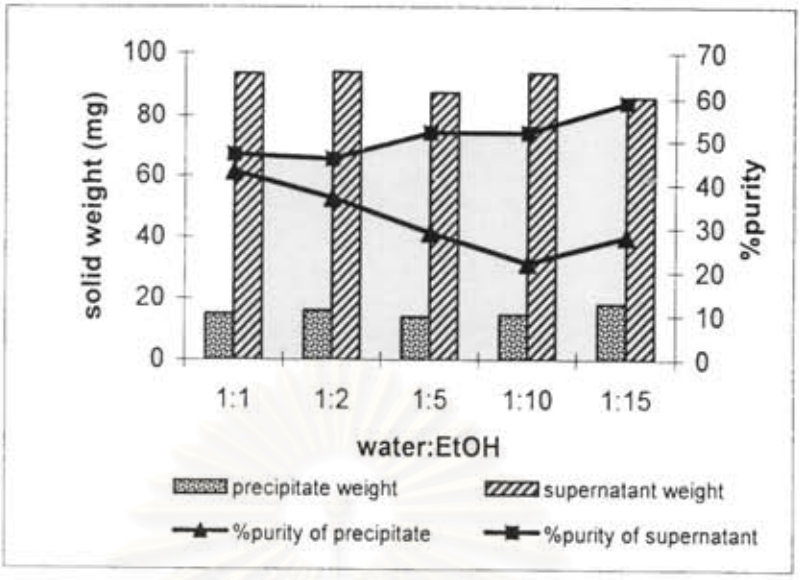


Figure 3 %recovery and %purity of precipitates and supernatants from the precipitation of $(GlcNAc)_2$ from crude product.

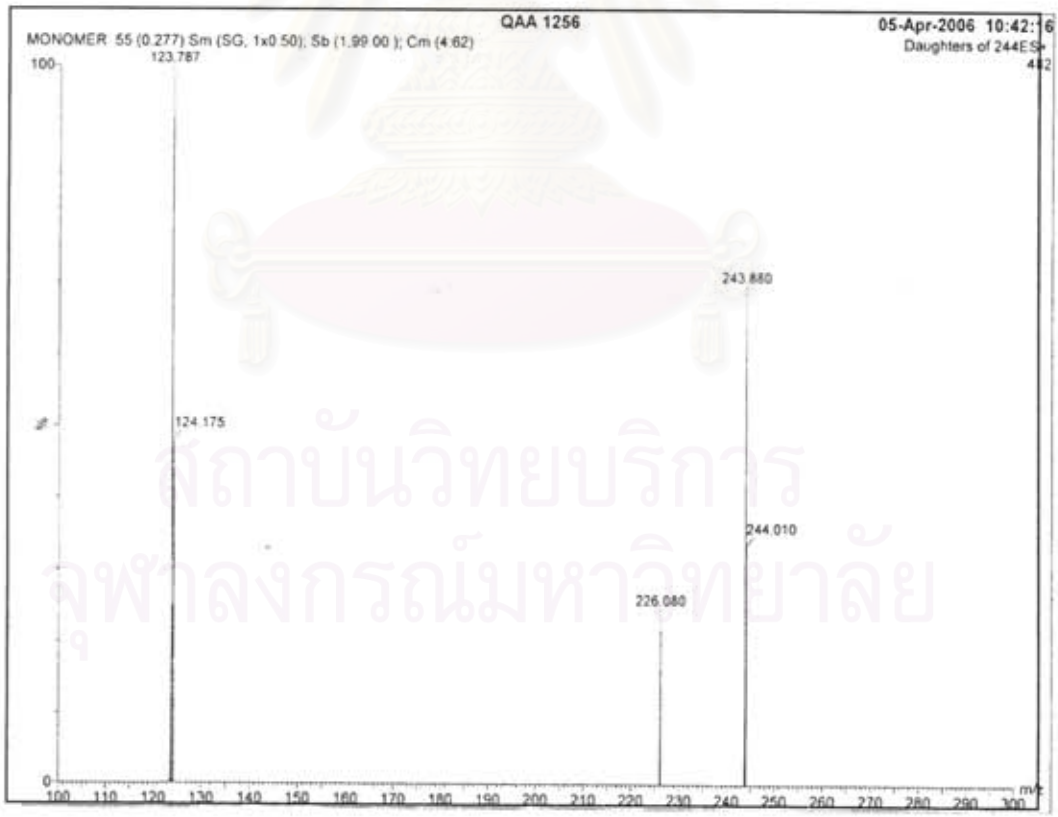
2.2.3) Activated charcoal column chromatography

เมื่อเร็วนี้ Yoon ได้รายงานว่า $(GlcNAc)_2$ สามารถถูกแยกจากของผสมจากผลิตภัณฑ์ไคตินที่ถูกย่อยโดยการใช้คอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์ เพื่อให้ได้$(GlcNAc)_2$ ที่บริสุทธิ์[23] ในงานนี้ใช้วิธีนี้เพื่อแยก$(GlcNAc)_2$ จาก crude product ที่ได้จากการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์ ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น ระบบตัวชะ (eluent system), loading capacity ของคอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์และปริมาตรสารละลาย crude $(GlcNAc)_2$ โดยได้วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Mass spectrometry เพื่อตรวจสอบการแยกระหว่าง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$

a) Monitoring of separation between GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$

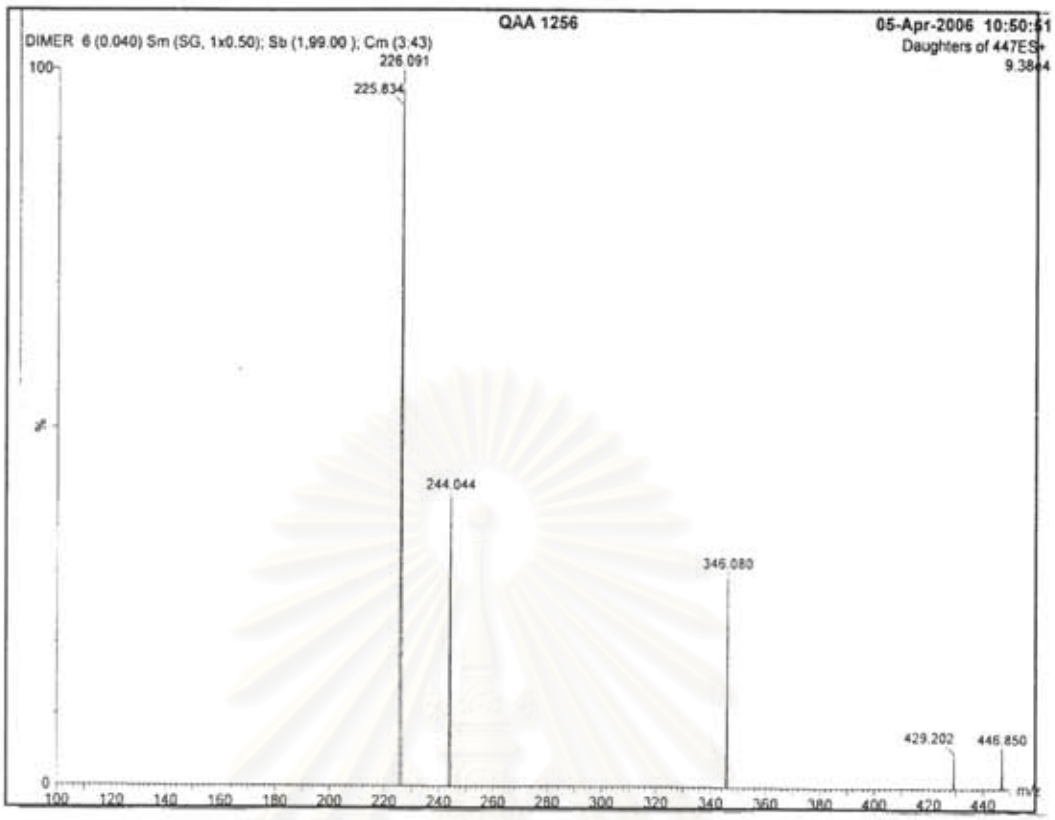
ทุกปัจจัยในการMS สแกนโหมดสำหรับ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ มาตรฐานถูกปรับเพื่อให้ได้สัญญาณที่เหมาะสม Voltage ในรูเล็กๆ (capillary), extractorและเลนท์ RF เป็น 40 kV, 3 V และ 0 V ตามลำดับ กรวยvoltageในแต่ละมาตรฐานเท่ากับ 37 และ 57 V สำหรับ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ตามลำดับ แหล่งที่ให้อุณหภูมิและอุณหภูมิ desolvation ถูกปรับให้เป็น 120 และ 150°C ตามลำดับ อัตราการไหลของ ไนโตรเจนก๊าซ เท่ากับ 550 L/hr เพื่อทำการละลายและ 50 L/hr สำหรับส่วนกรวย ด้วยปัจจัยต่างๆเหล่านี้สัญญาณที่สูงที่สุดของ $[GlcNAc+Na]^+$ เท่ากับ 244 m/z และ $[(GlcNAc)_2+Na]^+$ เท่ากับ 477 m/z ความตั้งใจของ MS1 ถูกปรับเพื่อให้ได้ความกว้างพีคอยู่ระหว่าง 0.7-0.9 m/z low mass resolution และ high mass resolution เท่ากับ 13.5 และ daughter scan mode ถูกเลือกหลังจากที่ปรับพารามิเตอร์ต่างๆจากสารมาตรฐาน ก๊าซอาร์กอนถูกให้ไหลผ่านชนเซลล์ พลังงานจากการชนถูกปรับขณะที่พลังงานจากไอออนที่ทางเข้าละทางออกถูกกำหนดไว้ที่ 2 พลังงานจากการชนที่ดีที่สุดสำหรับเพื่อหยุดโมเลกุลของ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ เท่ากับ 14 กับ 27 ตามลำดับ Daughter ion ของ $[AcNH(C_2H_2OH)+Na]^+$ เท่ากับ 123.787 m/z และ $[GlcNAc-H_2O+Na]^+$ เท่ากับ 226.080 m/z ได้ถูกเลือกเพื่อ GlcNAc และ

Daughter ion ของ$[(GlcNAc)_2 - H_2O+Na]^+$ เท่ากับ 226.092, $[(GlcNAc)_2-(GlcNAc) +Na]^+$ เท่ากับ 244.044, $[(GlcNAc)_2-AcNH(C_2H_2OH) +Na]^+$ เท่ากับ 346.080 ถูกเลือกเพื่อ$(GlcNAc)_2$ในโหมด MRM โดยทั่วไปในการหาปริมาณของ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ควรที่จะสามารถเป็นไปได้โดยการใช้พื้นที่ใต้พีคของ daughter ionที่ถูกเลือกจากโหมด MRM อย่างไรก็ตามพื้นที่ใต้พีคที่ได้มาจากสารละลายมาตรฐานของ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ไม่เหมือนกันในแต่ละครั้งภายใน 5% บางทีเป็นเพราะ voltage และสภาพแวดล้อมไม่คงที่จึงส่งผลให้การเกิด ionization เกิดการผันผวน การหาปริมาณทั้งหมดสามารถเชื่อได้จากการวิเคราะห์ด้วย วิธี MS/MS โดยการใช้มาตรฐาน internal isotropic ซึ่งมาตรฐาน isotropic ที่หาไม่ได้นั้น เพราะฉะนั้น พื้นที่ใต้พีคของพีคที่ถูกเลือกมีเพียงความสัมพันธ์ทางความหมายเพียงพอเพื่อการศึกษาประสิทธิภาพของการแยกของการชะ (elution) เท่านั้น วิธี MS/MS ถูกในการศึกษาครั้งนี้เพราะเป็นเทคนิคที่ประโยชน์ทางด้านวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและสะดวกสบาย



a)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

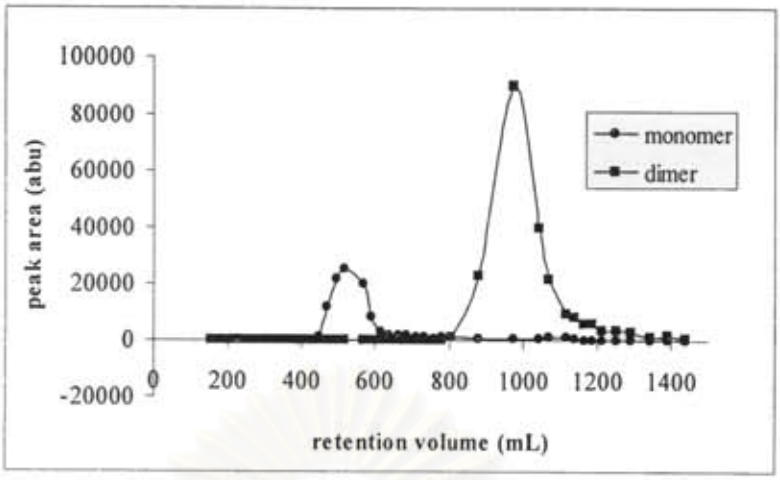


b)

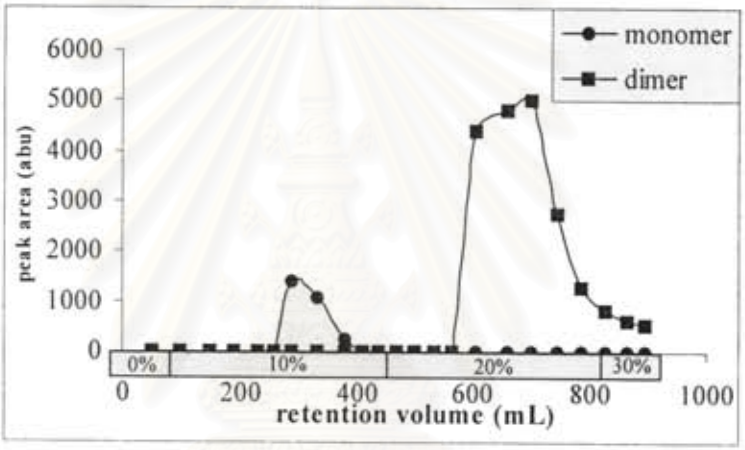
Figure 4 Mass spectrum of a) GlcNAc and b) $(GlcNAc)_2$

b) Elution system

ในครั้งแรก การแยก GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ จะเป็นเส้นลาดตรงของน้ำและ30%เอทานอล การชะนี้ทำให้ได้การแยกระหว่าง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ เกิดขึ้นดีมาก แต่ต้องใช้ตัวชะประมาณ 1400 มิลลิลิตรและใช้เวลามากกว่า 10 ชั่วโมงถึงจะสำเร็จระบบการชะ **(Figure 4a)** โครมาโตแกรมแสดงว่า 10%เอทานอลชะเฉพาะ GlcNAc แต่ไม่ชะ $(GlcNAc)_2$ เป็นไปได้ว่ากระบวนการชะสั้นเกินไป ซึ่งเป็นการใช้การชะทีละขั้น ในครั้งที่สองของการทดลอง ใช้0-10%เอทานอลปริมาตร 500 mL เป็นตัวชะครั้งแรกสามารถชะ GlcNAc ได้สำเร็จ **(Figure 4b)** หลังจากชะ GlcNAc ได้สำเร็จแล้ว ใช้ 20% เอทานอลเพื่อชะ $(GlcNAc)_2$ ในการทดลองครั้งที่สองนี้สิ้นสุดระบบการชะหลังจากผ่านไป 8 ชั่วโมงสามารถชะ $(GlcNAc)_2$ ออกมาได้หมดด้วยการใช้ตัวชะประมาณ 1000 mL จากผลการทดลองนี้พบว่า การใช้ 10%การชะทีละขั้นเร็วกว่าการชะปกติ



a)



b)

Figure 5 Chromatogram of GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ eluted by a) 5% ethanol stepwise gradient and b) 10% ethanol stepwise gradient

c) Loading capacity of the activated charcoal column

การผันผวนของจำนวน crude product จากการย่อยด้วยเอนไซม์ ถูกนำผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่บรรจุผงถ่านกัมมันต์ 60 กรัม โครมาโตแกรม แสดงถึงว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 1.86 กรัม สามารถแยก (R = 1.7) ระหว่าง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ได้ดี (**Figure 6** และ **Table 4**) หลังจากการทำให้แห้งของแต่ละส่วนรวมกันของ $(GlcNAc)_2$ น้ำตาลที่ได้มาเป็นของแข็งสีขาว และมีความบริสุทธิ์สูง

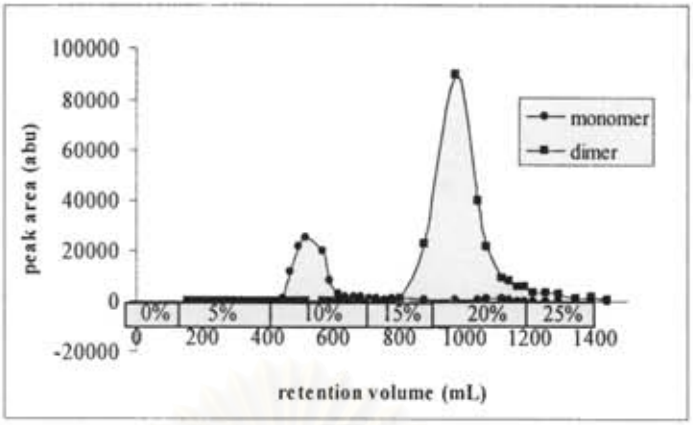


Figure 6 Chromatogram of activated charcoal column loading by 0.44 g of total GlcNAc and $(GlcNAc)_2$.

GlcNAc+$(GlcNAc)_2$ Weight (g)	$(GlcNAc)_2$ obtained (g)	R	% purity determined by HPLC
0.44	0.37	1.8	98
0.89	0.85	3.2	100
1.86	1.63	1.7	90

Table 4 Column resolution between GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ at various amount of loading sugars

3. วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* เพื่อเตรียม เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และ เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส [$(GlcNAc)_2$] ดำเนินการไปได้เป็นที่พึงพอใจ การตกตะกอน และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการนำเอา crude product ที่ตกตะกอนได้มาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่บรรจุผงถ่านกัมมันต์ อย่างไรก็ตามการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์โคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารผสมระหว่าง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ และและเมื่อใช้ขบวนการตกตะกอนในการแยกผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารผสมนี้ให้บริสุทธิ์เลยทำให้เปอร์เซนต์การผลิตของ $(GlcNAc)_2$ ลดลงไปบ้าง

การทำให้บริสุทธิ์คอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่บรรจุผงถ่านกัมมันต์นั้นมีประสิทธิภาพที่ดี สามารถแยกทั้ง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ให้บริสุทธิ์ได้ อย่างไรก็ตามยังมีหลายปัจจัยที่ต้องศึกษาเพื่อเพิ่มเปอร์เซนต์การผลิต

ในส่วนของการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้นนั้น ได้เริ่มเตรียมสารละลายไคตินพร้อมด้วยการผสมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้นในอัตราส่วนที่ 1:1 ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่จะนำไปทำการทดลองการย่อยต่อไป

4. สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

การย่อยไคตินจากแกนหมึกด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* สามารถผลิตเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และเอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส [$(GlcNAc)_2$] อย่างเฉพาะเจาะจงได้ เอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g of chitin) สามารถย่อยไคติน (3% w/v) ที่ pH เป็น 3 อุณหภูมิ 40°C ได้ผลิตภัณฑ์เป็น GlcNAc ด้วยเปอร์เซนต์ผลผลิต 72% ภายในเวลา 2 วัน การย่อยไคติน (3% w/v) ด้วยเอนไซม์จากโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* (1 U/1 g of chitin) ที่ pH เท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37°C ทำการบ่มเป็นเวลา 6 วันให้ผลิตภัณฑ์เป็น $(GlcNAc)_2$ และ GlcNAc ด้วยเปอร์เซนต์ผลิตภัณฑ์ 43% และ 2.6% ตามลำดับ การทำให้ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล ตามด้วยการกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์หรือใช้คอลัมน์ที่มีผงถ่านกัมมันต์ให้ GlcNAc บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซนต์ผลผลิต 64% และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซนต์ผลผลิต 40% สำหรับการเสนอแนะในการวิจัยขั้นต่อไปการทำให้บริสุทธิ์คอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่บรรจุผงถ่านกัมมันต์นั้นมีหลายปัจจัยที่ต้องปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น และสามารถแยกทั้ง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ให้บริสุทธิ์ได้ดีขึ้นอีก

ในส่วนของการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้นนั้น ได้เริ่มเตรียมสารละลายไคตินพร้อมด้วยการผสมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้นในอัตราส่วนที่ 1:1 และพร้อมที่จะเริ่มทำการทดลองการย่อยด้วยคลื่นอัลตราโซนิเคเตอร์ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บรรณานุกรม

1) Sigma-Aldrich "Biochemicals and Reagents for Life Science Research" Catalog **2004-2005**, p.45 and p.625.

2) Shikhman, A.R.; Kuhn, K.; Alaaeddine, N., and Lotz, M., "*N*-Acetylglucosamine Prevents IL-1 Beta-Mediated Activation of Human Chondrocytes", *J. Immunology*, **2001**, *166*, 5155-5160.

3) Shahidi, F.; Kamil, J.; Arachchi, V.; Jeon, Y.J., "Food applications of chitin and chitosan", *Trends in Food Science & Technology*, **1999**, *10*, 37-51.

4) Suzuki, S., "Studies on Biological Effects of Water Soluble Lower Homologous Oligosaccharides of Chitin and Chitosan", *Fragrance J.*, **1996**, *15*, 61-68.

5) O. Scheel and J. Thiem, eds. "Cleavage of chitin by means of aqueous hydrochloric acid and isolation of chito-oligosaccharides". *Chitin Handbook*, ed. R. A. Muzzarelli and M. G. Peter. 1997, *Atec Edizioni: Grottammare AP*, Italy. 165.

6) Suzuki, K.; Mikami, T.; Okawa, Y.; Suzuki, S., and Suzuki, M., "Antitumor Effect of Hexa-*N*-Acetylchitohexaose and Chitohexaose", *Carbohydr. Res.*, **1986**, *151*, 403-408.

7) Yamada, A.; Shibuya, N.; Kodama, O., and Akatsuka, T., "Induction of Phytoalexin Formation in Suspension-Cultured Rice Cells by *N*-Acetyl-chitooligosaccharides", *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1993**, *57*, 405-409.

8) Vander, P.; Vrum, K. M.; Domard, A.; Eddine, N.; Gueddari, E., and Moerschbacher, B. M., "Comparison of The Ability of Partially *N*-Acetylated Chitosans and Chitooligosaccharides to Elicit Resistance Reactions in Wheat Leaves", *Plant Physiol.*, **1998**, *118*, 1353-1359.

9) Hiroshi, H., "Disaccharide as Starting Materials for The Synthesis of Valuable Compounds", *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **2000**, *12*, 185-190.

10) Rupley, J.A., "The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme", *Biochem. Biophys. Acta*, **1964**, *83*, 245-255.

11) Izume, M.; Nagae, S.; Kawagishi, H.; Ohtakara, A., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1992**, *56*, 1327-1328.

12) Muzzarelli, R.A.A.; Peter, M.G., *Chitin Handbook*, Atec. Eddizioni, Italy, **1997**, 147-151.

13) Izume, M.; Ohtakara, A., "Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by enzymatic hydrolysis of chitosan", Agric. *Biol. Chem.*, **1987**, *51*(4), 1189-1191.

14) Rattanakit, N.; Yano, S.; Wakayama, M.; Plikomol A.; Tachiki, T.; "Sacharification of Chitin Using Solid-State Culture of *Aspergillus* sp S1-13 with Shellfish Waste as a Substrate", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2003**, *95*(4), 391-396.

15) Auyunirudronkul, K.; "Production of amino sugar from squid pen chitin by fungal biocatalyst" A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Petrochemistry and Polymer Science Faculty of Science Chulalongkorn University Academic Year **2003**, ISBN 974-17-3724-6.

16) Binod, P.; Pusztahelyi, T.; Nagy, V.; Sandhya, C.; Szakács, G.; Pócsi, I.; Pandey, A.; "Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation", *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, *36*, 880-887.

17) Ramírez, C. L.; Marín-Cervantes, M. C.; Huerta, S.; Revah, S ; Shirai, K.; "Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases", *Process Biochemistry*, **2005**, *41*, 1106-1110.

18) Patidar, P.; Agrawal, D.; Banerjee, T.; Patil, S., "Optimization of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation", *Process Biochemistry*, **2005**, *40*, 2962–2967.

19) Reguera, G., and Leschine, S., "Chitin degradation by cellulolytic anaerobes and facultative aerobes from soils and sediments", *FEMS Microbiology Letters*, **2001**, *204*, 367-374.

20) Pichyangkura, R.; Kudan, S.; Kuttiyawong, K.; Sukwattanasinitt, M.; Aiba, S., "Quantitative production of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose from crystalline chitin by bacterial chitinase", *Carbohydrate Research*, **2002**, *337*, 557–559.

21) Ramírez, G.; Avelizapa, R.; Avelizapa, R.; Camarillo, C., "Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R® a useful substrate to select chitinolytic microorganisims and to evaluate chitinase", *Microbiological Methods*, **2004**, *56*, 213-219.

22) Yuli, P.; Suhartono, M. T.; Rukayadi, Y.; Hwang, J. K.; Pyun, Y. R., "Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26", *Enzyme and Microbial Technology*, **2004**, *35*, 147-153.

23) Kuk, J. H.; Jung, W. J.; Jo, G. H.; Ahn, J. S.; Kim, K. Y., and Park, R. D., "Selective preparation of *N*-acetyl-D-glucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose from chitin using a crude enzyme preparation from *Aeromonas* sp.", *Biotechnology Letters*, **2004**, *27*, 7-11.

24) Kuk, J. H.; Jung, W. J.; Jo, G. H.; Ahn, J. S.; Kim, K. Y., and Park, R. D., "Production of *N,N'*-diacetylchitobiose from chitin using temperature-sensitive chitinolytic enzyme preparations of *Aeromonas* sp. GJ-18", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **2005**, *22*, 135-139.

25) Purchase, R. and Braun, E., "D-Glucosamine Hydrochloride", *Org. Syn.*, **1946**, *26*, 36-37.

26) Novikov, V.Yu.; et al., "Synthesis of (+)-glucosamine hydrochloride", *Russian Journal of Applied Chemistry.*, **1997**, 70, 1467-1470.

27) Gandhi, N. and Laidler, J.K., "Preparation of glucosamine hydrochloride", *US patent 6,486,307 B1.*, **2002**.

28) Nivikov V. Yu., "Acid hydrolysis of chitin and chitosan", *Russian Journal of Applied Chemistry*, **2004**, 77, 484-487.

สัญญาเลขที่ GRB_๒๖_๕๐_๒๓_๐๒

โครงการวิจัยเรื่อง แผนงานวิจัยนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่

การรายงานความก้าวหน้าผลการดำเนินงาน (ครั้งที่ 3)

รายงานช่วงระยะตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2549 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2550

หัวหน้าโครงการ: รองศาสตราจารย์ ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์

หน่วยงาน: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

๑. การดำเนินงาน: [✓] ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ
[ ] ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้ คือ .....

๒. สรุปผลการดำเนินงาน

สามารถย่อยไคตินด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* เพื่อเตรียม เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และ เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส $(GlcNAc)_2$ ไปได้ในระดับที่น่าพอใจ เหลือแต่รายละเอียดในการทำให้ผลิตภัณฑ์ทั้งสองบริสุทธิ์ ซึ่งขบวนการนี้อยู่ในระหว่างการดำเนินงาน

ในขณะเดียวกันเราได้เริ่มศึกษาการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริคเพื่อเตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) โดยการย่อยนี้เราได้นำเอาโซนิเคเตอร์เข้ามาช่วยในการย่อยด้วยซึ่งเป็นขบวนการใหม่ที่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อน

๓. การดำเนินงานในช่วงต่อไป

- ปรับปรุงขบวนการทำให้ผลิตภัณฑ์ทั้งสอง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์
- ศึกษารายละเอียดของการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริคเพื่อเตรียม GlcNHCl โดยใช้โซนิเคเตอร์เข้ามาช่วยในการย่อย

๔. อุปสรรคในการดำเนินงาน และแนวทางแก้ไข

เงินอุดหนุนทุนวิจัยที่ได้รับค่อย ๆมาเป็นงวด ๆและล่าช้า จึงเป็นผลทำให้การวิจัยเป็นไปได้อย่างไม่ต่อเนื่อง และช่วงระยะเวลาในการรายงานความก้าวหน้าถี่เกินไปทำให้มีเวลาให้กับการวิจัยไม่เพียงพอ ระยะเวลาของการรายงานความก้าวหน้าควรปรับให้เป็น 6 เดือนต่อครั้ง

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์)
หัวหน้าโครงการวิจัย
4 / 02 / 51